

Andrzej K. Siwicki, Krzysztof Kazuń, Barbara Kazuń, Edward Głąbski, Agnieszka Lepa

Zakład Patologii i Immunologii Ryb Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

Wpływ β -glukanu (Leiber®Beta-S) na nieswoiste humoralne mechanizmy obronne u narybku karpia (*Cyprinus carpio*)

Wstęp

W podchowach kontrolowanych ryb istnieje stale zagrożenie chorobami, wynikające z obniżenia odporności powodowanej stresem polietiologicznym. Wynikiem takiego stanu jest wzrost zachorowalności na choroby wirusowe, bakteryjne czy grzybicze. W profilaktyce chorób ryb coraz większego znaczenie nabierają preparaty naturalne i syntetyczne wykazujące działanie modulujące na nieswoiste mechanizmy obronne (Siwicki i in. 1998).

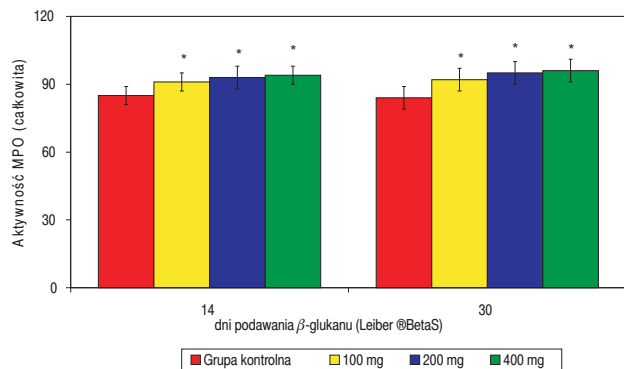
Liczne badania potwierdziły, że β -glukany wykazują właściwości antyoksydacyjne oraz immunomodulujące (Brown i Gordon 2003, Chen i Seviour 2007, Lull i in. 2005, Mańczewska i in. 2010, Siwicki i in. 2009). Na uwagę zasługuje również fakt, że β -D-glukany zaliczane są do istotnych prebiotyków stymulujących z jednej strony wzrost i aktywność naturalnej flory jelitowej, a z drugiej wykazują działanie hamujące rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych (Saduła i in. 1999, Silke i in. 2007, Yadav i Schorey 2006). Istotną cechą β -glukanów jest również ich zdolność do stymulacji biosyntezy kolagenu przez pobudzone fibroblasty. Dzięki tym właściwościom, β -glukany przyspieszają procesy regeneracji tkanek oraz uczestniczą w gojeniu ran. Liczne badania pokazały, że β -glukany izolowane z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykazują działanie immunotropowe i zaliczane są do grupy naturalnych preparatów immunostymulujących. β -Glukany są aktywatorami funkcji układu siateczkowo-śródlazmatycznego, wpływają stymulująco na komórkowe i humoralne mechanizmy obronne oraz odporność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i przeciwnowotworową. Efektem powodowanej przez β -glukany aktywacji układu immunologicznego jest wzmożenie mobilizacji komórek tego układu, w miejscu pojawienia się czynnika chorobotwórczego. Działanie immunostymulujące β -glukanów jest wynikiem przyłączania się tych cząsteczek do specyficznych receptorów obecnych na powierzchni komórek immunokompetentnych, tj. makrofagach, monocytach, neutrofilach oraz limfocytach T i B. Komórki te, dzięki obecności swoistych receptorów, rozpoznają strukturę β -glukanów, co zapoczątkowuje komórkową i humo-

ralną odpowiedź immunologiczną. Liczne badania doświadczalne na zwierzętach wykazały, że β -glukany zwiększają aktywność metaboliczną i fagocytarną komórek MN i PMN oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów T i B stymulowanych mitogenami (Brown i Gordon 2003, Chen i Seviour 2007, Mańczewska i in. 2010, Siwicki i in. 2009, Tsipali i in. 2001, Wójcik i in. 2009, Wójcik 2010). Na rynku pojawiło się wiele preparatów w skład których wchodzi β -glukany o różnej budowie i rozpuszczalności w wodzie (Leiber-Beta S, Biolex-Beta HP, MacroGard). Ich działanie immunomodulujące wykazano w badaniach *in vivo* na różnych gatunkach zwierząt. Najbardziej efektywne jest podawanie β -glukanów *per os* przez okres 30 dni w dawkach od 200 do 500 mg na kg paszy (Mańczewska i in. 2010, Siwicki i in. 2009, Wójcik 2010).

Celem badań było określenie wpływu β -glukanu (Leiber®Beta-S) na nieswoiste humoralne mechanizmy obronne u narybku karpia (*Cyprinus carpio*).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na narybku karpia o masie ciała 15-17 g, który był w dobrej kondycji, klinicznie zdrowy, a badaniami mikrobiologicznymi wykluczono obecność patogennych wirusów: herpeswirusa karpia 3 (CyHV-3), wirusa wiosennej wirerii karpia (SVCV) oraz bakterii z rodzaju *Aeromonas*. Ryby pochodziły z Rybackiego Zakładu Doświadczalnego IRS w Żabieńcu. Po 2-tygodniowej adaptacji, ryby podzielono na 4 grupy po 100 sztuk i przetrzymywano w basenach 1000-litrowych z objętością wody i napowietrzaniem w temperaturze 20-22°C. Ryby grupy doświadczalnej karmiono paszą komercyjną (Bestfed, Polska) z dodatkiem β -glukanu (Leiber®Beta-S), który został zamknięty w granulacie metodą próżniową w dawce 100, 200 oraz 400 mg na kg granulatu. Natomiast ryby grupy kontrolnej karmiono paszą bez dodatku β -glukanu. Karpie wszystkich grup doświadczalnych i kontrolnej karmiono jeden raz dziennie przez okres 30 dni, w ilości odpowiedniej dla masy ciała i temperatury wody. Krew do badań immunologicznych pobierano od 10 sztuk ryb każdej grupy doświadczalnej i kontrolnej po 14 i 30 dniach



Rys. 1. Wpływ różnych dawek β -glukanu (Leiber @BetaS) na 1 kg paszy na aktywność mieloperoksydazy (MPO) w neutrofilach krwi u narybku karpia (wartości średnie \pm SD, n = 10, * – różnice statystycznie istotne, $P \leq 0,05$).

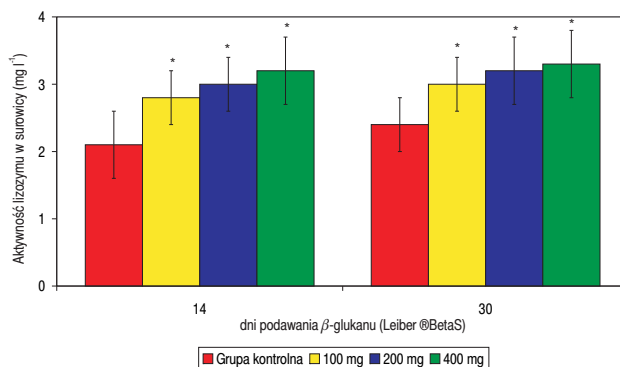
podawania preparatu. Przed pobraniem krwi z żyły ogonowej ryby były wprowadzane w stan znieczulenia ogólnego preparatem Propiscin (IRS Olsztyn).

Badania nieswoistych humoralnych mechanizmów obronnych obejmowały ocenę aktywności lizozymu, mieloperoksydazy i ceruloplazminy oraz białka całkowitego i poziomu immunoglobulin w surowicy. Z pełnej świeżej krwi przygotowywano preparaty do oznaczania mieloperoksydazy w neutrofilach, a następnie po odwirowaniu krwi, w surowicy oznaczano aktywność lizozymu i ceruloplazminy oraz całkowity poziom immunoglobulin (Ig). Aktywność mieloperoksydazy (MPO) oznaczano metodą opisaną przez Siwickiego i in. (1993a). Aktywność lizozymu w surowicy oznaczano metodą turbidymetryczną opisaną przez Siwickiego i Anderson (1993b) oraz aktywność ceruloplazminy metodą spektrofotometryczną (Siwicki i in. 2003). Poziom białka całkowitego oznaczano metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawu firmy Sigma Diagnostics Kits (Siwicki i Anderson 1993b) oraz całkowity poziom Ig oznaczano metodą spektrofotometryczną przy użyciu glikolu etylenowego 10000 (Sigma) opisaną przez Siwickiego i Andersona (1993b).

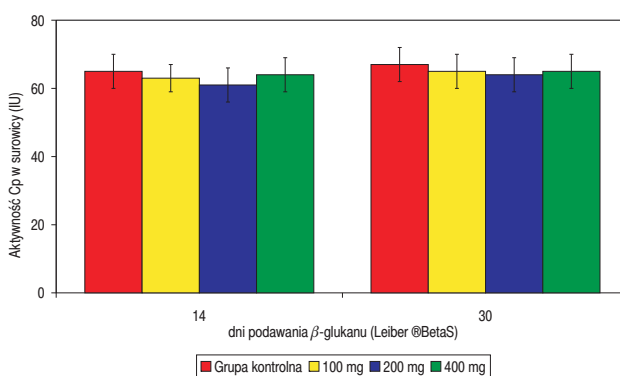
Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej określając wartości średnie, odchylenie standardowe (SD) przy użyciu programu Statistica for Windows 7.1 (Stat-Soft, Inc 2004) oraz istotność różnic na poziomie $P < 0,05$ przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

Wyniki i dyskusja

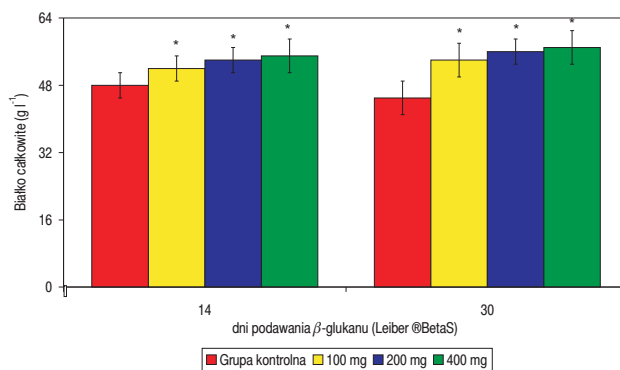
W ostatnich latach obserwuje się w hodowli karpia pojawienie się nowych chorób wirusowych i bakteryjnych, które powodują znaczące straty ekonomiczne (Siwicki 2011, Siwicki i in. 2012). Również intensyfikacja produkcji materiału zarybieniowego oraz zmiany żywieniowe predysponują do występowania stresu, który ma negatywny wpływ na nieswoiste mechanizmy obronne i odporność przeciwważną. Badania własne miały na celu określenie



Rys. 2. Wpływ różnych dawek β -glukanu (Leiber @BetaS) na 1 kg paszy na aktywność lizozymu w surowicy u narybku karpia (wartości średnie \pm SD, n = 10, * – różnice statystycznie istotne, $P \leq 0,05$).

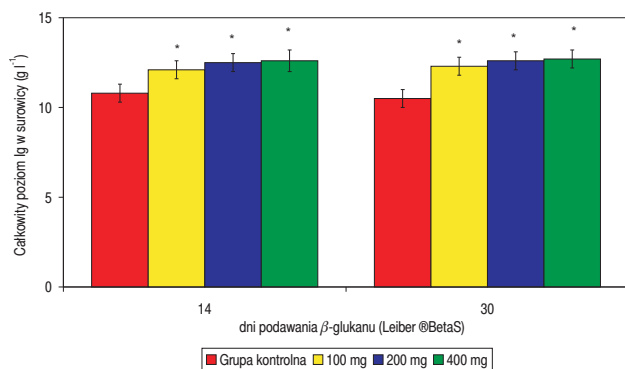


Rys. 3. Wpływ różnych dawek β -glukanu (Leiber @BetaS) na 1 kg paszy na aktywność ceruloplazminy (Cp) w surowicy u narybku karpia (wartości średnie \pm SD, n = 10).



Rys. 4. Wpływ różnych dawek β -glukanu (Leiber @BetaS) na 1 kg paszy na poziom białka całkowitego w surowicy u narybku karpia (wartości średnie \pm SD, n = 10, * – różnice statystycznie istotne, $P \leq 0,05$).

wpływu różnych dawek β -glukanu (Leiber @Beta-S) podawanego w paszy na nieswoiste humoralne mechanizmy obronne w intensywnym podchowcie narybku karpia. Uzyskane wyniki badań przedstawiono na rycinach 1-5. W 14 dniu podawania β -glukanu (Leiber @Beta-S) w dawkach 100, 200 i 400 mg kg^{-1} obserwowano statystycznie istotnie ($P < 0,05$) wyższe, w porównaniu z grupą kontrolną, aktywności mieloperoksydazy w neutrofilach krwi (rys. 1) oraz lizozymu w surowicy (rys. 2), przy braku zmian w aktywności ceruloplazminy (rys. 3), istotnego dla ryb białka ostrej



Rys. 5. Wpływ różnych dawek β -glukanu (Leiber @BetaS) na 1 kg paszy na poziom Ig w surowicy u narybku karpia (wartości średnie \pm SD, n = 10, * – różnice statystycznie istotne, $P \leq 0,05$).

fazy. Również obserwowano statystycznie istotny ($P < 0,05$) wzrost poziomu białka całkowitego (rys. 4) i całkowitego poziomu Ig (rys. 5) we wszystkich badanych grupach doświadczalnych, w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast w 30 dniu podawania β -glukanu (Leiber @Beta-S) obserwowano dalszy statystycznie istotny wzrost aktywności mieloperoksydazy w neutrofilach (rys. 1) oraz aktywności lizozymu w surowicy (rys. 2), przy braku zmian w aktywności ceruloplazminy (rys. 3), w porównaniu z grupą kontrolną. Równocześnie obserwowano dalszy statystycznie istotny wzrost poziomu białka całkowitego (rys. 4) i Ig (rys. 5) w surowicy. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że najwyższy wzrost badanych parametrów obserwowano w grupach karpia, które otrzymywały dawki 200 i 400 mg na kg paszy. Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic w badanych parametrach między grupami ryb, które otrzymywały β -glukan (Leiber @Beta-S) w dawce 200 i 400 mg na kg paszy, co może sugerować, że dawka 200 mg kg^{-1} jest optymalna dla narybku karpia w podchowach kontrolowanych. Obserwacje kliniczne prowadzone w trakcie doświadczenia wykazały, że dwukrotnie wyższa dawka nie miała negatywnego wpływu na stan kondycyjny i zdrowotny badanych ryb oraz nie spowodowała statystycznie istotnych zmian w oznaczanych parametrach nieswoistej odporności humoralnej, w porównaniu z dawką 200 mg na kg paszy.

Uzyskane wyniki badań jednoznacznie wykazały, że β -glukan (Leiber @Beta-S) podawany w paszy w dawce optymalnej 200 mg na kg paszy aktywuje nieswoiste humoralne mechanizmy obronne u narybku karpia. Badania innych autorów wykazały, że podawanie glukanów wyizolowanych z *Saccharomyces cerevisiae* w paszy wpływa pozytywnie na stan kondycyjny, wzrost oraz obraz histologiczny przewodu pokarmowego i wątroby ryb (Bricknell i Dalmo 2005, Sakai 1999). Również Siwicki i in (2011) wykazali, że β -glukan (Leiber @Beta-S) w dawce 100 i 200 mg na kg paszy podwyższa swoistą odpowiedź immunologiczną po podaniu szczepionki przeciwko *Yersinia ruckeri*

u pstrąga tęczowego, co jednoznacznie wskazuje, że badany β -glukan zwiększa efektywność szczepień u ryb.

Podjęte badania miały na celu poszukiwanie nowych, wysoce efektywnych i mało toksycznych metod ochrony zdrowia karpia, szczególnie w okresach największego zagrożenia chorobami. Przewiduje się dalsze intensywne badania nad możliwością stosowania β -glukanu (Leiber @Beta-S) nie tylko w podchowach kontrolowanych, ale również w chowie stawowym karpia. Wcześniejsze badania wykazały, że patogenność CyHV-3 związana jest z indukcją immunosupresji na poziomie komórkowym i humoralnym, co przyspiesza rozwój choroby i zwiększa straty hodowlane spowodowane masowymi śnięciami (Siwicki i in. 2012). Jedną z metod ograniczających straty powodowane tym wirusem może być stosowanie naturalnych immunostymulatorów, do których zaliczamy badany β -glukan (Leiber @Beta-S). Badania w tym zakresie będą kontynuowane.

Literatura

- Bricknell I., Dalmo R.A. 2005 – The use of immunostimulants in fish larval aquaculture – *Fish Shellfish Immunol.* 19: 457-472
- Brown G., Gordon S. 2003 – Fungal β -Glucans and mammalian immunity – *Immunity* 19: 311-315.
- Chen J., Seviour R. 2007 – Medicinal importance of fungal β -(1,3-1,6)-glucans – *Mycological Research* 111: 635-652.
- Lull C., Wichers H.J., Savelkoul H.F.J. 2005 – Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites – *Mediators of Inflammation* 2: 63-80.
- Małaczewska J., Wójcik R., Jung L., Siwicki A.K. 2010 – Effect of Biolex β -HP on selected parameters of specific and non-specific humoral and cellular immunity in rats – *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 54: 75-80.
- Sadula J., Kogan G., Kacurkova M., Machova E. 1999 – Microbial 1,3-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity – *Carbohydrate Polymers* 8: 247-253.
- Sakai M. 1999 – Current research status of fish immunostimulants – *Aquaculture* 172: 63-92.
- Silke C.J., Rohn S., Kroch L.W., Kurz T. 2007 – *In vitro* potential antioxidant activity of -1,3-1,6-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls – *Agric. Food. Chem.* 55: 4710-4716.
- Siwicki A.K. 2011 – Important infectious diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.) – Training Network on Protective Immune Modulation in Warm Water Fish by Feeding Glucans, PAN Gołysz: 11-15.
- Siwicki A.K., Anderson D.P., Antychowicz J. 1993a – Nonspecific defence mechanisms assay in fish I. Phagocytic index, adherence and phagocytic ability of neutrophils (NBT test) and myeloperoxidase activity test – *Fish Disease Diagnosis and Preventions Methods*. Wyd. IRS Olsztyn: 95-103.
- Siwicki A.K., Anderson D.P. 1993b – Nonspecific defence mechanisms assay in fish II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum – *Fish Disease Diagnosis and Preventions Methods*. Wyd. IRS Olsztyn: 105-111.
- Siwicki A.K., Kazuń K., Lepa A., Kazuń B. 2011 – Influence of 1,3-1,6-D-glucan (Leiber Beta-S) in diets on the effectiveness of anti-Enteric Redmouth Disease (AquaVac ERM) vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – *Centr. Eur. J. Immunol.* 36: 212-214.
- Siwicki A.K., Lepa A., Terech-Majewska E., Kazuń K., Głąbski E. 2012 – Herpesvirus karpia -3 (CyHV-3): aktualny stan wiedzy oraz wpływ CyHV-3 na nieswoiste humoralne mechanizmy obronne karpia (*Cyprinus carpio* L.) – *Komun. Ryb.* 2: 11-16.
- Siwicki A.K., Morand M., Klein P. 1998 – Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish – *Acta Vet. Brno* 67: 323-328.
- Siwicki A.K., Zakęś Z., Trapkowska S., Terech-Majewska E., Czerniak S., Głąbski E., Kazuń K. 2003 – Nonspecific cellular and humoral defence mechanisms in pikeperch (*Sander lucioperca*) grown in a intensive system of culture – *Arch. Pol. Fish.* 11: 207-212.
- Siwicki A.K., Zakęś Z., Terech-Majewska E., Kazuń K., Lepa A., Głąbski E. 2009 – Dietary Macrogard reduces *Aeromonas hydrophila* mortality in

- tench (*Tinca tinca*) through the activation of cellular and humoral defence mechanisms – Rev. Fish Biol. Fisheries DOI 10.1007/s11160-009-9133-2.
- Tsipali E., Whaley S., Kalbfleisch J., Ensley H.E., Browder W., Williams D.L. 2001 – Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity – Free Rad. Biol. Med. 30: 393-402.
- Wójcik R., Janowska E., Mańczewska J., Siwicki A.K. 2009 – Effect of β -1,3/1,6-D-glucan on the phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats – Bull. Vet. Inst. Pulawy 53: 241-246.
- Wójcik R. 2010 – Effect of Biolex Beta-HP on phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats intoxicated by cyclophosphamide – Pol. J. Vet. Sciences 13: 181-188.
- Yadav M., Schorey J. 2006 – The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria – Blood 108: 3168-3176.

Przyjęto do druku: 11.06.2012 r.

INFLUENCE OF β -GLUCAN (LEIBER @BETA-S) ON NONSPECIFIC HUMORAL DEFENSE MECHANISMS IN FINGERLING CARP, *CYPRINUS CARPIO* L.

Andrzej K. Siwicki, Krzysztof Kazuń, Barbara Kazuń, Edward Głąbski, Agnieszka Lepa

ABSTRACT. Nutritional support is important for optimum health in fish as it provides the building blocks of innate defense mechanisms and thus protection against infectious diseases. In the present study, we determined the influence of β -glucan (Leiber @Beta-S) delivered with food on the nonspecific humoral defense mechanisms in fingerling carp. The fish weighed 15-17 g. Four tanks in a recirculation system were stocked with 100 fish each. The water temperature was 20-22°C. The fish were fed daily with commercial pellets containing β -glucan (Leiber @Beta-S) at doses of 100, 200, and 400 mg per kg of pellets. The feed was prepared by the carp protocol used at the Inland Fisheries Institute. The control group was fed glucan-free pellets. On days 14 and 30 of the experiment, blood was drawn from 10 fish from each group and the nonspecific humoral defense mechanism parameters were examined. The results showed that β -glucan (Leiber @Beta-S) at doses of 100, 200, and 400 mg per kg of pellets increased the myeloperoxidase activity in blood leukocytes and lysozyme activity in the serum. Total protein and immunoglobulin (Ig) levels were also increased in the serum. The optimal stimulating effect was observed following 30 days of application at a dose of 200 mg of β -glucan (Leiber @Beta-S) on kg of pellets in fingerling carp.

Keywords: carp, β -glucan (Leiber @Beta-S), innate humoral immunity